

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Reti Anmann

**Uropatogeense *Escherichia coli* seerumitolerantsuses osalevad faktorid**

Bakalaureusetöö

Juhendaja teadur Marta Putrinš

TARTU 2015



# Sisukord

<b>Kasutatud lühendid .....</b>	<b>5</b>
<b>Sissejuhatus .....</b>	<b>6</b>
<b>1 Kirjanduse ülevaade.....</b>	<b>7</b>
1.1 Uropatogeenne <i>Escherichia coli</i> (UPEC) ja tema poolt põhjustatud haigused .....	7
1.1.1 Uroinfektsioon .....	7
1.1.2 Baktereemia .....	8
1.2 Komplementisüsteem .....	9
1.2.1 Klassikaline rada.....	9
1.2.2 Lektiini rada.....	9
1.2.3 Alternatiivne rada .....	10
1.3 Uropatogeense <i>E. coli</i> virulentsus .....	12
1.3.1 UPEC virulentsusfaktorid.....	12
1.3.2 Virulentsuse regulatsioon .....	13
1.3.3 Bakteripopulatsiooni heterogeensus .....	14
<b>2 Eksperimentaalosa .....</b>	<b>15</b>
2.1 Töö eesmärgid .....	15
2.2 Materjalid ja meetodika.....	16
2.2.1 Kasutatud bakteritüved, söötmed, plasmiidid.....	16
2.2.2 DMSO säilituskultuuri valmistamine .....	17
2.2.3 Glütserooli säilituskultuuride valmistamine.....	18
2.2.4 PCR ( <i>polymerase chain reaction</i> - polümeraasi ahelreaktsioon).....	18
2.2.5 Kompetentsete rakkude valmistamine.....	18
2.2.6 Elektroporatsioon .....	19
2.2.7 Verest seerumi eraldamine .....	19
2.2.8 <i>E. coli</i> CFT073 tüve seerumitundlikuse katse .....	19
2.3 Tulemused .....	21
2.3.1 Geenide <i>rscB</i> ja <i>marA</i> katkestamine <i>Escherichia coli</i> CFT073 tüvel .....	21
2.3.2 Polüsahhariidse kapsli roll <i>E. coli</i> tüve CFT073 seerumitolerantsuses.....	24
2.4 Arutelu .....	29

<b>Kokkuvõte .....</b>	<b>32</b>
<b>Factors that play role in blood serum tolerance of uropathogenic <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>33</b>
<b>Kasutatud kirjandus .....</b>	<b>34</b>
<b>Kasutatud veebiaadressid .....</b>	<b>39</b>
<b>Lihtlitsents.....</b>	<b>40</b>
<b>Tänu sõnad .....</b>	<b>41</b>

## Kasutatud lühendid

CFU – bakterikolooniat moodustavate rakkude arv (ingl *colony forming unit*)

DMSO – dimetüülsulfoksiid

ExPEC – ekstraintestinaalne patogeenne *E. coli*. (ingl *extraintestinal pathogenic E. coli*)

g – suhteline tsentrifugaaljõud

GFP – roheline fluorestseeruv valk (ingl *green fluorescent protein*)

HIS – kuumusega inaktiveeritud seerum (ingl *heat inactivated serum*)

IBC- rakusisene bakterite kogum (ingl *intracellular bacterial community*)

Km- kanamütsiin

LB – toitaineterikas sööde bakterite kasvamiseks (*lysogeny broth*)

OD<sub>600</sub> – optiline tihedus 600nm juures

PBS – fosfaatpuhver (ingl *phosphate buffered saline*)

SOB- bakterisööde (ingl *super optimal broth*)

UPEC – uropatogeenne *E. coli*. (ingl *uropathogenic E. coli*)

UTI – kuseteede infektsioon (ingl *urinary tract infection*)

## Sissejuhatus

*Escherichia coli* on väga mitmekesine bakteriliik, keda võib leida looduslikult nii inimese kui ka mitmete teiste loomaliikide soolestikust. Lisaks mitte-patogeensetele tüvedele on üks osa *E. coli* tüvedest võimelised põhjustama seedetrakti infektsioone, teine osa aga ekstra-intestinaalseid infektsioone, kuhu kuulub ka käesolevas töös kasutatav uroinfektsiooni põhjustav uropatogeenne *E. coli* (UPEC) tüvi CFT073.

Uroinfektsioonid on üks sagedasemaid passiivselt omandatavaid bakteriaalseid infektsioone. Umbes 90% ambulatoorsetest uroinfektsioonidest (UTI) on põhjustatud just UPEC-i poolt. Keskmiselt 50% naistest on 20. eluaastaks kogenud UTI-t ning nendest umbes 20-30% põevad seda korduvalt ka hilisemas eas. Kui uroinfektsiooni ei ravita võib toimuda ka infektsiooni levimine kusejuhasid pidi neerudesse, kus edasi võivad bakterid satuda juba verre ning põhjustada baktereemiat ning halvemal juhul ka sepsist.

Seoses UPEC-i poolt põhjustatava UTI ja baktereemiaga on palju vastamata küsimusi. Meid huvitab täpsemalt see, millised faktorid tagavad *E. coli* CFT073 tüvel seerumitolerantsuse.

Mehhanismide paremaks mõistmiseks teostasime rida katseid, kus jälgisime UTI-t põhjustava *E. coli* CFT073 metsiktüübi ja vastava tüve kapslimutandi elulemust inimese vere seerumis. Inimese veres paikneb nii adaptiivse kui ka kaasasündinud immuunkaitsesse kuuluv komplemendisüsteem, mis enam kui 30 valgu koostoimes kehaväliseid patogeene hävitavad.

UPEC-i virulentsus on väga tugevalt reguleeritud. Käesolevas töös kontrueerisime *marA* ja *rcsB* geenide suhtes defektsed tüved. *marA* ja *rcsB* geeniproduktideks on regulaatorvalgud, mis mõjutavad UPEC-i virulentsust uroinfektsiooni tekitamisel. Defektsete tüvede puhul soovime edaspidi uurida, kuidas vastava regulaatorvalgu puudumine mõjutab CFT073 tüve ellujäämist seerumis.

Käesolev töö on koostatud Tartu Ülikooli Tehnololoogiainstituudis Tanel Tensoni juhitud töögrupis.

Märksõnad: UPEC, UTI, komplemendisüsteem

# 1 Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Uropatogeenne *Escherichia coli* (UPEC) ja tema poolt põhjustatud haigused

*Escherichia coli* on imetajate normaalsesse mikrofloorasse kuuluv bakter, mis on peremeesorganismiga sümbiootilises suhtes. Seedetraktis aitab *Escherichia coli* hoida stabiilset sooletiku mikrofloorat ning homöostaasi (Yan ja Polk, 2004). Normaalsesse mikrofloorasse kuluvatel *E. coli* tüvedel puuduvad üldiselt virulentsed omadused, kuid esineb ka patogeenseid tüvesid, mis jaotatakse intestinaalseteks ja ekstratestinaalseteks haigust tekitavateks tüvedeks (ExPEC) vastavalt selle, kus need täpselt haigust põhjustavad (Russo ja Johnson, 2000).

ExPEC tüvedest on kõige levinumad uropatogeenne *E. coli* (UPEC) ja neonataalset meningiiti põhjustav *E. coli* (Kapner jt, 2004; Russo ja Johnson, 2000). Intestinaalsed *E. coli* tüved põhjustavad harva infektsioone väljaspool organismi seedekulglat. ExPEC tüved on säilitanud võime eluneda soolestikus (haigust ei põhjusta), ent suudavad tungida ka mujale peremeesorganismis: verre, kesknärvisüsteemi ja kuseteedesse (Wiles jt, 2008).

### 1.1.1 Uroinfektsioon

Kuseteede infektsioone peetakse üheks levinumaks inimestel esinevaks infektsiooniks. Hinnanguliselt 50% naistest ning 12% meestest kogeb oma elu jooksul vähemalt korra uroinfektsiooni (Foxman, 2003). Umbes veerand nendest naistest kogeb korduvalt infektsiooni 6-12 kuu jooksul (Foxman jt, 2000). Uropatogeense *E. coli* põhjustatud uroinfektsiooni kordumine on kolm korda tõenäolisem kui mitte-UPEC-i põhjustatud kuseteede põletiku korral (Wiles jt, 2008). Enamik uropatogeene pärineb soolestiku mikrofloorast ning pääseb kuseteedesse kusiti kaudu (Mulvey, 2002). Et hoiduda peremeesorganismi kaitsereaktsioonist, on UPEC tüvedel välja kujunenud võime paljuneda põie epiteelrakkude sees ning neist sobival ajal väljuda. Uute rakkude väljumise korral on UPEC tüve rakkudel võimalus siseneda epiteeli külgnevatesse ja alumistesse rakukihtidesse. Selle tulemusena võib tekkida olukord, kus korduinfectiooni põhjustavad bakterid ei pärine enam peremeesorganismi soolestikust ega mujalt uroteedest, vaid paiknevad konstantselt põie epiteelrakkudes (Mulvey jt, 2001). Kogu protsessi tulemusena väike populatsioon rakke

filamenteerub epiteeli rakkudes ja väljub sealt, kinnitudes taas epiteelrakkude pinnale pikkade filamentidena. Arvatakse, et see on patogeeni kaitsemehhanism peremeesorganismi poolt esile kutsutava fagotsütoosi eest (Hunstad ja Justice, 2010). Epiteeli rakkudes moodustavad patogeensed bakterid biofilmi-laadse moodustise, mille kriitilised komponendid on eksopolüsahhariidne maatriks ja tüüp 1 piilid. On täheldatud ka muude välismembraani valkude rolli organiseeritud struktuuri, biofilmi, moodustamisel (Anderson jt., 2003; Justice jt., 2005; Wright jt., 2007). Selliseid moodustunud reservuaare tuntakse IBC-dena (ingl *intracellular bacterial community*), tänu millele on patogeen paremini kaitstud peremeesorganismi immuunsüsteemi hävitava toime eest. UPEC võib nii organismi põies märkamatusena püsida mitu kuud, kuna selline organiseeritud struktuur pakub kaitset ka antibiootikumide eest. IBC-del on täheldatud resistentsus kolme- ja kümnapäevastele antibiootikumi ravikuuridele (Mulvey jt., 2001) .

#### 1.1.2 Baktereemia

*E. coli* on kõige sagedasem Gram-negatiivne bakter, mis põhjustab baktereemiat (Russo ja Johnson, 2003). Baktereemiaks nimetatakse olukorda, kui organismi veres esinevad elujõulised bakterid. UPEC-i puhul toimub bakterite sisenemine verre neerude kaudu. Püelonefriidi ehk ägeda neerupõletiku korral on bakterid võimelised ületama neerutorukese epiteelrakkude kihi ning kapillaaride endoteeli rakkude kihi, tungides nii vereringesse, mis võib mõningatel juhtudel lõppeda sepsisega. Sepsis tekib juhul, kui immuunsüsteem aktiveerub. Baktereemia korral võib bakter kasutada verd ka levimiseks organismi teistesse organitesse, põhjustades seeläbi põletikke originaalsest põletikukoldest eemal (Smith jt, 2010).



## 1.2 Komplementisüsteem

Komplementisüsteem on üks olulisemaid osasid kaasasündinud immuunkaitstes, olles vereplasma valkude kogum, mille komponendid omavahelises koostoimes ründavad rakuväliseid patogeene. Süsteem võib aktiveeruda spontaanselt või patogeenile seostunud antikeha kaudu (Rus jt., 2005). Inimese vere seerum sisaldab enam kui 30 komplementisüsteemi kuuluvat valku, mis on olulised nii kaasasündinud kui ka omandatud immuunkaitstes. (Sarma ja Ward, 2011). Komplementisüsteemi vaadeldakse kui silda adaptiivse ja kaasasündinud immuunkaitse vahel (Dunkelberger ja Song, 2010).

Komplementisüsteem on aktiveeritav läbi kolme erineva raja, mille tulemusena mikroorganism kas opsoniseeritakse, mis indutseerib selle fagotsütoosi, või moodustub membraaniründe kompleks ehk MAC (ingl *membrane attack complex*), mille tulemusena bakterirakk lüüsub (joonis 1) (Zipfel jt., 2013).

### 1.2.1 Klassikaline rada

Klassikaline rada käivitatakse antigeen-antikeha kompleksi äratundmisega võõr-raku pinnal heksameerse C1 valgukompleksi poolt. C1 kompleks koosneb C1q komponendist ja kahest molekulist – C1r ja C1s. C1q komponendi seostumisel antigeen-antikeha kompleksile aktiveeruvad C1r ja C1s koos C1s-i esteraasi moodustumisega, millele järgneb C4 ja C2 molekulide seondumine. C4-C2 kompleks hakkab osaliselt lagunema ja võimaldab nii klassikalisele rajale omase C3 konvertaasi (C4b2a) moodustumist (Sarma ja Ward, 2011).

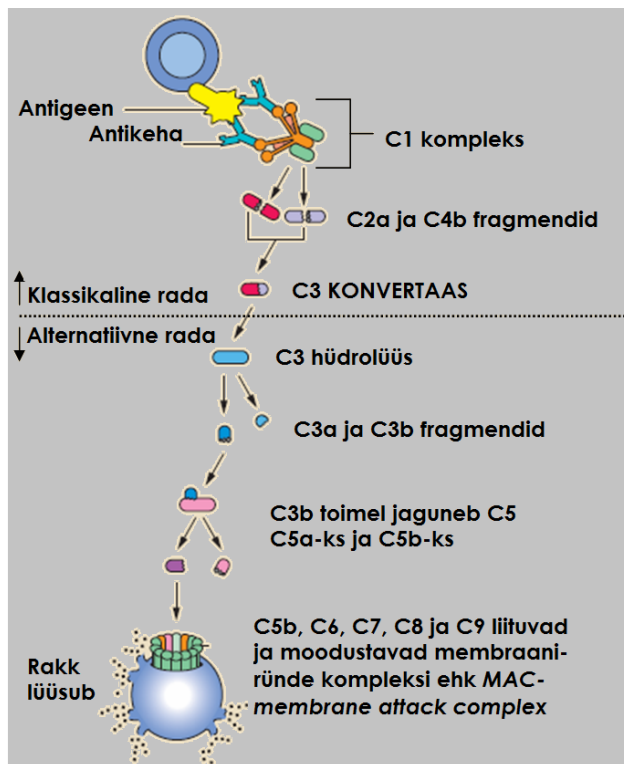
### 1.2.2 Lektiini rada

Lektiini rada käivitatakse juhul kui mannoos-seoseline lektiin (MBL – ingl *mannose binding lectine*) ja fikoliinid seonduvad bakterirakkude pinnal paiknevatele karbohüdraatrühmadele. MBL-d ja fikoliinid on tüüpilised äratundmise molekulid, mis seovad endaga MBL-seoselised seriinproteasid (MASP – ingl *MBL-associated serine protease*) 1, 2 ja 3, aktiveerides seeläbi MASP esteraasi. Aktivatsioonil MASP lagundab ja aktiveerib C4 ja C2 molekulid, moodustades nii C3 konvertaasi (C4b2a), mis on omane ka klassikalisele rajale (Sarma ja Ward, 2011).

### 1.2.3 Alternatiivne rada

Alternatiivne rada on stimuleeritud algse C3 molekuli spontaanselt hüdrolüüsist või kehavõõraste pinnastruktuuride poolt. Aktivatsioon toimub seriini proteaasi, faktor D, toimetel, mis lagundab faktor B Ba-ks ja Bb-ks. Faktor B on enne lagunemist seondunud spontaanselt hüdrolüüsitud C3b-ga. Moodustub alternatiivsele rajale omane C3 konvertaas, C3bBb. Properdiin (eritavad aktiveeritud neutrofiilid) tõstab nii C3 kui C5 konvertaasi aktiivsust. Alternatiivse raja aktivaatorite alla kuuluvad bakteriaalsed ja mikroobsed fragmendid, kasvajakud, viiruste kapsiidid, plastilised pinnad, perifeerne närvi müelliin ning rakusisesed organelid. Need aktivaatorid inhibeerivad C3 konvertaasi inaktiveerimist faktorite H ja I poolt. Faktorid H ja I on olulised komplemendisüsteemi regulaatorid, mis põhjustavad C3b ja Bb lagunemist (Sarma ja Ward, 2011).

Pärast C3 konvertaasi moodustumist kolm komplemendisüsteemi rada koonduvad ja konvertaasi toimetel lagundatakse C3 valk C3a-ks ja C3b-ks. Moodustub C5 konvertaas, mis omakorda lagundab C5 komplemendi valgu, tekivad C5b ja C5a. C5b seondub järgmiste komplemendi valkudega – C6, C7 ja C8. Seondumise tulemusena moodustub C5b-8 kompleks siseneb patogeeni membraani, kus kompleksile seondunud C9 valgu polümerisatsiooni tulemusena moodustub MAC ning toimub kanali moodustumine ja raku lüüsumine (Sarma ja Ward, 2011).



**Joonis 1. Komplementisüsteemi aktiveerivad klassikaline ja alternatiivne rada.**

Klassikalise raja puhul tunneb C1 kompleks ära võõraku pinnal oleva antigeen-antikeha kompleksi. Seondumise tagajärjel tekkivad fragmendid lagundavad C2 ja C4 valgud. Antud valkude lagunemise tagajärjel moodustub C3 konvertaas. Alternatiivse raja puhul toimub C3 valgu spontaansel hüdrolüüsil, mille tagajärjel tekivad C3a ja C3b. C3b toimel jaguneb C5 valk C5a ja C5b-ks, millest viimane osaleb membraaniründe kompleksi moodustumisel (MAC). MAC-i toimel tekivad võõraku membraani poorid ning rakk lüüsub (Sarma ja Ward, 2011).

Kohandatud [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Complement\\_pathway.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Complement_pathway.png).

### 1.3 Uropatogeense *E. coli* virulentsus

UPEC-i võime põhjustada sümptomaatilisi UTI-sid on seotud laiaulatuslike virulentsusfaktorite ekspressiooniga, mis võimaldavad patogeeni koloniseerida kuseteid ning vältida peremeesorganismi kaitsemehhanisme (Bien jt, 2012).

#### 1.3.1 UPEC virulentsusfaktorid

Üldiselt on põis steriilne keskkond ja kuseteedesse sisenemisel peab patogeen vastu pidama suurele hulgale antimikroobsetele toimetele ning ka põie tühjenemisel tekkivale uriini voolule. Seetõttu on uroinfektsiooni põhjustava patogeeni esimeseks kriitiliseks ülesandeks kinnitada kuseteid katvale kaitsvale epiteelile. Kinnitumiseks on patogeensetel bakteritel välja kujunenud erinevad adhesiinid. Adhesiinid on molekulaarsed komponendid raku pinnal, mis vahendavad seondumist teistele rakkudele või pindadele. Uropatogeensetel *Escherichia coli* tüvedel esinevad adhesiinidest S- , P- , tüüp 1 piilid ning Dr-perekonna adhesiinid (Johnson, 1991).

Tüüp 1 piilidel on ka teine oluline roll kuseteede infektsiooni (UTI) tekkimisel. Lisaks patogeeni kinnitumise ülesandele vahendab tüüp 1 piili adhesiin FimH ka patogeeni sissetungi peremeesorganismi põieepiteeli rakkudesse (Martinez jt, 2000). Patogeensete bakterite invasioon epiteelirakkudesse käivitab põieepiteeli pealmise kihi rakkude koorumise, mis toimub läbi apoptoositaolise mehhanismi ja on peremeesorganismi efektiivne kaitsestrateegia patogeeni vastu võitlemisel (Mulvey, 1998).

*E. coli* elutegevuseks on kriitiliselt vajalik raua olemasolu keskkonnas. Peremeesorganismi üks viise infektsioonide vastu võitlemisel on infektsioonipiirkonnast raua eemaldamine. Raud seotakse valkudega ja transporditakse vereplasmast rakusiseseks talletamiseks. Selleks, et väliskeskkonnast rauda omastada, on mikroobidel siderofoorid. Siderofoorid on mikroobide poolt sünteesitavad väiksed molekulid, mis eritatakse raku pinnale ning millel on suur afiinsus raua-ioonide suhtes (Neilands, 1995; Henderson jt, 2009). *E. coli* kasutab väliskeskkonnast raua omastamiseks nelja erinevat siderofoori: aerobaktiin, enterobaktiin, jersiniabaktiin ja salmokeliin (Henderson jt, 2009). *E. coli* poolt sünteesitavatest siderofooridest on kõige olulisemad rauavaesest keskkonnast raua kättesaamiseks enterobaktiin ja aerobaktiin (Watts jt, 2012). Inimese organismis hakkama saamiseks on tõenäoliselt kõige efektiivsem aerobaktiin, kuna selle afiinsus raua suhtes on neutraalse pH puhul suurem kui enterobaktiinil. Enterobaktiin seostub ka komplemendivalkudele ning võib selle tagajärjel kutsuda esile

peremeesorganismi immuunvastuse (Johnson, 1991). Erinevates töödes on näidatud ka piilide roll raua omastamisel keskkonnast (Zhang ja Normak, 1996).

Pindseotud polüsahhariidse kapsli süntees on UPEC tüvede seas üsna levinud. Kapsel tagab steriilise barjääri, kaitstes nii välismembraani peremeesorganismi kaitsemehhanismide eest. Kapsel on tugevasti seotud raku pinnaga ning enamikel juhtudel sisaldab K (kapsli)-antigeeni. Kõige enam on bakterimaailmas levinud K1 tüüpi kapsel, aga esineb ka teisi kapslite tüüpe, näiteks K2, mida ekspresseerib ka käesolevas töös kasutatav uropatogeenne *E. coli* tüvi CFT073 (Johnson, 1991). Bakterimaailmas enamlevinud K1 tüüpi kapsel koosneb omavahel seotud N-atsetüülneuramiinhappejääkidest ning omab kaitsefunktsiooni faagide ja peremeesorganismi komplemendisüsteemi eest. Samuti mängib K1 tüüpi kapsel rolli ka IBC-de moodustamisel (Allen jt, 1987; Anderson jt, 2010; Scholl jt, 2005). Uropatogeensel *E. coli*-l esinev K2 kapsel koosneb teihhoiinhappe-laadsest polümeerist. Edukalt on demonstreeritud K2 kapsli rolli *E. coli* uropatogeense tüve puhul, kus kapsel kaitseb komplemendisüsteemi lüüsva toime eest ja annab ka eelise kuseteede koloniseerimisel võrreldes tüvega, mis sellist tüüpi kapslit ei oma (Buckles jt, 2009).

### 1.3.2 Virulentsuse regulatsioon

Kogu virulentsus on UPEC-i puhul väga kõrgelt reguleeritud ning faktorid, mis osalevad kuseteede infektsiooni tekitamises, on olulised ka patogeeni verre tungimiseks ning seal ellu jäämiseks (Smith jt, 2010).

*E. coli* CFT073 tüvele omase eksopolüsahhariidi, kolaanhappe, süntees toimub ainult kindlates keskkonnatingimustes, olles reguleeritud kahekomponendilise Rcs-fofaatraja poolt, mida on seostatud biofilmi moodustamise ja kuivamise ärahoidmisega. Eksopolüsahhariid (kolaanhape) mängib olulist rolli ka UPEC-i seerumitolerantsuses (Miajlovic jt, 2014). Kahekomponendilise Rcs-fosfaatraja poolt reguleeritud kolaanhappe biosüntees on vajalik peptidoglükaankihti mitte-omavatele *E. coli* rakkudele taastumiseks ja ellujäämiseks *de novo* rakuseina sünteesil. Seerumitolerantne *E. coli* CFT073 tüvi võib sarnaselt sünteesida kolaanhapet, et taastada seerumi komplemendi kahjulikust toimest (Miajlovic ja Smith, 2014).

Kuid Rcs-fosfaatrada pole ainuke regulaator, mis *E. coli* tüve CFT073 virulentsust mõjutab. AraC perekonna valgud MarA, Rob ja SoxS on olulised transkriptsioonifaktorid, mis reguleerivad UPEC-i virulentsust ägeda neerupõletiku korral (Casaz jt, 2006). On üsna

tõenäoline, et paljud UPEC-i virulentsusfaktorid, mis osalevad UTI tekkimises, on olulised ka seerumis ellujäämiseks (Smith jt, 2010).

Välismembraani terviklikkuse ja struktuuri säilitamine on olulised seerumitolerantsuse tagamisel. UPEC on võimeline siduma välismembraanis paiknevate valkudega komplemendisüsteemi faktoreid, tagades nii veres ellujäämise. UPEC-i poolt ekspresseeritud OmpA valk seob edukalt komplemendisüsteemi reguleerivat valku C4b, inhibeerides nii komplemendisüsteemi raja ning patogeeni lüüsimist ei toimu (Miajlovic ja Smith, 2014).

### 1.3.3 Bakteripopulatsiooni heterogeensus

Lisaks virulentsusfaktoritele ja nende regulatsioonile, on teada, bakteripopulatsioon ei ole alati homogeenne (Bigger, 1944). Mikroobipopulatsioonide võime jääda ellu muutuvates keskkonnatingimustes on seotud fenotüübilise heterogeensussega. Mõisted „fenotüübiline varieeruvus“ ja „fenotüübiline heterogeensus“ viitavad epigeneetilistele populatsiooni variatsiooni allikatele, mis ei hõlma genoomisisesid muutusi. Tavaliselt on sellised muutused meta- või ebastabiilsed ning pole põlvest põlve päranduvad (Dhar ja McKinney, 2007).

Fenotüübiline heterogeensus võimaldab bakterirakkudel ellu jääda vaatamata bakteritsiidsete ainete (antibiootikumide) mõjule. Selliseid bakteripopulatsiooni-siseseid rakke nimetatakse persistoriteks. Persistorid on rakud, mis moodustavad fenotüübiliselt erineva subpopulatsiooni geneetiliselt sarnases bakteripopulatsioonis. Persistentsus on bakteripopulatsioonis mööduv ja mitte-päranduv fenotüüp ning ilmneb iseeneslikult (Dhar ja McKinney, 2007).

Ka inimese vere seerumi komplemendisüsteemi vältimise ning ellujäämise võib *E. coli* CFT073 tüvele tagada bakteripopulatsiooni heterogeensus. Komplemendisüsteem lüüsib küll enamuse jagunevatest CFT073 rakkudest vere seerumi juuresolekul, kuid väiksemad subpopulatsioonid suikunud ning kiiresti jagunevatest rakkudest on võimelised vältima komplemendisüsteemi lüüsi toimet. Samuti kaitseb statsionaarse faasi suikunud seisund rakke antibiootikumide toime eest (Putrinš jt, 2015).

## 2 Eksperimentaalosa

### 2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgiks oli täpsemalt uurida UPEC tüve CFT073 seerumitolerantsuse mehhanisme. Selleks püstitati kaks eesmärki.

- 1) Katkestada *E. coli* CFT073 tüve genoomis *marA* ja *rscB* geenid selleks, et edaspidi uurida, mil määral nende geenide poolt kodeeritud regulaatorvalgud mõjutavad seerumitolerantsust.
- 2) Uurida CFT073 tüve polüsahhariidse kapsli rolli bakteri seerumitolerantsuses nii kiiresti jagunevate eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude kui ka statsionaarse kasvufaasi rakkude korral.

## 2.2 Materjalid ja metoodika

### 2.2.1 Kasutatud bakteritüved, söötmed, plasmiidid

Käesolevas töös kasutati *Escherichia coli* CFT073 (Mobley jt, 1990; Welch jt, 2002) bakteritüve. Töös kasutatud *E. coli* CFT073 *ksl* geeni suhtes mutantne tüvi (ei sünteesi K2 polüsahhariidset kapslit) on pärit H. Mobley laborist (Buckles jt, 2009). Kasutatud tüved ja plasmiidid on kantud tabelisse 1.

**Tabel 1.** Töös kasutatud tüved ja plasmiidid.

Nimetus	Iseloomustus	Allikas
<b><i>E. coli</i> tüvi</b>		
CFT073 wt	Serotüüp O6:K2:H1, isoleeritud ägeda neerupõletikuga patsiendi verest.	Mobley, 1990; Welch jt, 2002
CFT <i>ksl</i>	CFT073 $\Delta ksl(k2)ABCDE$ , K2 kapslit mitte-sünteesiv tüvi.	Buckles jt, 2009
CFT <i>rcsB::Km</i>	CFT073 $\Delta rcsB::Km$	Käesolev töö
CFT <i>marA::Km</i>	CFT073 $\Delta marA::Km$	Käesolev töö
CFT <i>rcsB</i>	CFT073 $\Delta rcsB$	Käesolev töö
CFT <i>marA</i>	CFT073 $\Delta marA$	Käesolev töö
<b>PLASMIID</b>		
pKD13	Madala koopiaarvuga plasmiid, milles kanamütsiinigeeni otstes on FRT (inglise keeles <i>flippase recognition target</i> ) äratundmise järjestused. Kanamütsiini resistentsus.	Datsenko ja Wanner, 2000
pKD46	Madala koopiaarvuga plasmiid, mis ekspresseerib <i>Red</i> -rekombinaasi süsteemi. <i>Red</i> -rekombinaasi geenide ekspressioon on indutseeritav L-arabinoosiga. Temperatuuritundlik replikatsioon. Ampitsilliini resistentsus.	Datsenko ja Wanner, 2000
pCP20	Madala koopiaarvuga plasmiid, mis ekspresseerib <i>Flp</i> -rekombinaasi geeni(e). Temperatuuritundlik replikatsioon. <i>Flp</i> -rekombinaasi ekspressioon on temperatuuriga indutseeritav. Ampitsilliini ja klooramfenikooli resistentsus.	Cherepanov ja Wackernagel, 1995
pETgfp- <i>mut2</i> AGGAGG	GFP (ingl <i>green fluorescent protein</i> ) <i>mut2</i> geeni kandev plasmiid. GFP ekspressioon on IPTG (isopropüül-D-tiogalaktopüranosiid) poolt indutseeritava promooteri kontrolli all. Kanamütsiini resistentsus.	Vimberg jt, 2007



Bakterite kasvatamiseks kasutati LB-Lennox Difco™ vedel- ja tardsöödet, millele oli lisatud vastavalt kanamütsiini lõppkontsentratsiooniga 25 µg/ml või ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml. Elektroporatsiooni-järgseid (punkt 2.2.5) rakke kasvatati SOC (ingl *super optimal broth with catabolite repression*) vedelsöötmes, mis oli saadud glükoosi (lõppkontsentratsiooniga 20 mM) ja MgSO<sub>4</sub> (lõppkontsentratsiooniga 10 mM) lisamisel SOB (ingl *super optimal broth*) vedelsöötmesse.

**Tabel 2. Töös kasutatud praimerid.** Praimereid *marA*-Km1, *marA*-Km2, *rcsB*-Km1 ja *rcsB*-Km2 kasutati kanamütsiini geeni amplifitseerimiseks plasmiidilt pKD13. Praimerite 3' otsas on kanamütsiinigeeniga komplementaarne ala märgitud paksus kirjas. Praimereid *marA*-up, *marA*-down, *rcsB*-up ja *rcsB*-down kasutati kontroll-PCR reaktsioonis veendumaks geenikatkestuse edukast toimumisest. Praimerid disainiti kasutades veebilehte [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome).

Praimeri nimetus	Praimeri järjestus
<i>marA</i> -Km1	5'-cttgagcatttgcttaagaaagtcctgccgtaaacgaaaaagaggtatg <b>attccggggatccgtcgacc</b> -3'
<i>marA</i> -Km2	5'-ttgcctcagtgacggtgtcacgttatcaactagttgttgaatgattaat <b>gtaggctggagctgcttcg</b> -3'
<i>rcsB</i> -Km1	5'-tgaaacgctggaacatctgattcgtttgctgtagcaaggtagcctattacatg <b>attccggggatccgtcgacc</b> -3'
<i>rcsB</i> -Km2	5'-ctgacgcgtcttatctggcctacaggtgattagctcttatctgccggact <b>gtaggctggagctgcttcg</b> -3'
<i>marA</i> -up	5'-aaaacctgacggcggacg-3'
<i>marA</i> -down	5'-cgcagttgctattgcggata-3'
<i>rcsB</i> -up	5'-tgctaaatctggtacccggc-3'
<i>rcsB</i> -down	5'-atccggcaatccgtgcaa-3'

### 2.2.2 DMSO säilituskultuuri valmistamine

DMSO säilituskultuuri valmistamiseks kasvatati rakke üleöö LB vedelsöötmes ning järgmisel päeval tehti sellest lahjendus värskesse LB vedelsöötmesse nii, et OD<sub>600</sub> oleks ~ 0,05. Rakke kasvatati seejärel umbes 2 tundi OD<sub>600</sub> ~ 0,8-ni. Rakukultuurile lisati DMSO-d (dimetüülsulfoksiid) 8% lõppsisalduseni ning jagati 120 µl kaupa tuubidesse. DMSO kultuuri säilitati -80°C juures. Kogu protsessi teostati jääkastil.

### 2.2.3 Glütserooli säilituskultuuride valmistamine

Bakterikolooniast inokuleeriti rakud 3 ml LB vedelsöötmesse ning kasvatati üleöö vastaval temperatuuril. Üleöö kultuure hoiti enne säilituskultuuride valmistamist jääl. 1,5 ml üleöö kasvanud kultuurile lisati seejärel 0,5 ml 60% glütserooli ning segati õrnalt. Säilituskultuure hoiustati tuubides -80°C juures.

### 2.2.4 PCR (*polymerase chain reaction*- polümeraasi ahelreaktsioon)

Reaktsioonisegu lõppmaht oli 50 µl, sisaldades järgmisi komponente: ampflifitseeritavat DNA-d (vastavalt, kas siis bakterirakud või plasmiid), 1 u FirePol<sup>®</sup> DNA polümeraasi kontsentratsiooniga 5u/µl, 10 pmol eelnevalt disainitud praimereid, SolisB 10-kordset puhvrit 1-kordse lõpplahjendusega, 25 mM MgCl<sub>2</sub>-te lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM, 10 mM dNTP lõppkontsentratsiooniga 0,2 mM ning destilleeritud vett. PCR-i läbiviimiseks kasutati masinat *Eppendorf Mastercycler personal*. Reaktsiooni korralti 26-30 tsüklis: 94°C 30 sekundit, 54-60°C (olenevalt praimeri seondumistemperatuurist) 30 sekundit, 72°C 2 minutit, 72°C 2 minutit.

PCR-i produkte vaadeldi 1% agarosgeelil, millele oli lisatud etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,2-0,5µg/ml. Geelelektroforeesi teostati 100 V juures, 1X TAE puhvris. Geeli vaadeldi UV-valguses.

### 2.2.5 Kompetentsete rakkude valmistamine

Kompetentsete rakkude valmistamiseks inokuleeriti rakud 3 ml LB vedelsöötmesse. Rakke kasvavati üleöö 30°C või 37°C juures loksutil *Sanyo orbital incubator*. Järgmisel päeval tehti rakukultuurist 200-kordne lahjendus 50 ml värskesse SOB söötmesse ning kasvatati 500 ml kolbides loksutil seni, kuni rakukultuuri OD<sub>600</sub> oli jõudnud ~0,3-ni. Seejärel pandi rakud jääle ning jahutati 20 minutit. Jahtunud rakukultuur valati steriilsesse 50 ml tuubi, mida oli eelnevalt hoitud jääl. Seejärel toimus rakkude korduv tsentrifuugimine 3000g juures 15 minutit temperatuuril 4°C: I tsentrifuugimine, mille järel eemaldati supernatant ning rakud suspendeeriti 25 ml külmas 10% glütserooli lahuses; II tsentrifuugimine, mille järel toimiti samamoodi nagu I etapis, kuid 25 ml asemel suspendeeriti 10 ml külmas 10% glütserooli lahuses; III etapp kordab II tsentrifuugimise etappi ning viimase, IV, tsentrifuugimise järel

lisati sademele 400 µl 10% glütserooli ning jagati 50 µl kaupa epsidesse. Saadud kompetentseid rakke säilitati -80°C juures.

#### 2.2.6 Elektroporatsioon

Elektroporatsioon teostati 0,2 cm küvettides, milles segati kokku 50 µl kompetentseid rakke ning vastav kogus PCR-il saadud DNA fragmente või plasmidi, mida sooviti rakkudesse sisestada. Transformatsioon viidi läbi masinaga GenePulse Xcell programmiga *E.coli* 2,5 kV 25 mF 200 Ω, millele järgnes kohene 1 ml sooja SOC söötme lisamine. PCR-i produktide poreerimisel kasutati SOC söödet, millele oli lisatud L-arabinoosi lõppkontsentratsiooniga 1 mM. Elektroporeeritud rakke kasvavati 1-2 tundi, kas 37°C või 30°C juures. Pärast kosumist, inokuleeriti rakud selekteerimiseks LB tardsöötmeplaadile, millele oli lisatud kanamütsiini lõppekontsentratsiooniga 25 µg/ml või ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml.

#### 2.2.7 Verest seerumi eraldamine

Veenivere proovid võeti hea tervise juures olevalt vabatahtlikult doonorilt. Verel lasti seista 30 minutit toatemperatuuril ja tsentrifuugiti 1700g juures 10 minutit. Seerum eraldati, jaotati 350 µl kaupa tuubidesse ning hoiustati -80°C juures. Enne katse sooritamist valiti sobiv kogus seerumit ning sulatati ja uuesti ei külmutatud. Kontrollkatsetes kasutati ka kuumaga inaktiveeritud seerumit, millel puudub bakterirakke lüüsiv toime. Seerumi komplemendisütseem inaktiveeriti vahetult enne katset, inkubeerides seda 56°C juures 30 minutit.

#### 2.2.8 *E. coli* CFT073 tüve seerumitundlikuse katse

Uuritava tüve DMSO säilituskultuurist tehti 1:100 lahjendus värskesse filtreeritud LB vedelsöötmesse ning kasvatati aeroobsetes tingimustes, kas statsionaarse (20 tundi) või eksponentsiaalse (2-3 tundi) kasvufaasini. Et indutseerida eelnevalt elektroporatsioonil (punkt 2.2.6) rakkudesse viidud pETgft-*mut2*AGGAGG plasmiidilt GFP (ingl *green fluorescent protein*) fluorestseeruva valguga sünteesi, lisati LB vedelsöötmesse IPTG (isopropüül-D-tiogalaktopüranosiid) lõppkontsentratsiooniga 1 mM. Rakud sadestati, pesti ja lahjendati 1X PBS-is OD<sub>600</sub> 0,1-ni. Rakud inokuleeriti 1:1 HIS-i (*heat inactivated serum*), seerumisse, LB-sse ja 1X PBS-i (fosfaatpuhver). Rakke inkubeeriti 37°C juures loksutamata. Proovid võeti

kindlates ajapunktides (0, 60, 120 ja 150 min) ning lahjendati 1X PBS-is. Lahjendatud proovidest kanti 5 µl LB tardsöötmega plaatidele ning inkubeeriti 37°C juures üleöö. Järgmisel päeval loendati kolooniad ning arvutati CFU (*colony-forming units*).

## 2.3 Tulemused

### 2.3.1 Geenide *rcsB* ja *marA* katkestamine *Escherichia coli* CFT073 tüvel

Selleks, et uurida *Escherichia coli* CFT073 seerumitolerantsuses osalevaid faktoreid, tuli läbi viia mitmeid geenikatkestusi. Katkestuste abil püüame mõista deleteeritavate geenide poolt kodeeritavate regulaatorvalkude vajalikkust seerumis ellujäämisel. *marA* ja *rscB* geenidefektsete tüvede konstrueerimiseks kasutasime Datsenko ja Wanneri (2000) metoodikat.

Homoloogiliseks rekombinatsiooniks nimetatakse protsessi, mille käigus toimub, kas ühe molekuli piires või kahes erinevas DNA molekulis sarnase järjestusega DNA regioonide vahetumine. Meie poolt kasutatav meetod põhineb  $\lambda$  faagi rekombinatsioonisüsteemil.

#### 2.3.1.1 Faag $\lambda$ *Red*-rekombinaasi kodeeriva plasmidi pKD46 viimine CFT073 tüvesse

Selleks, et saaks toimuda homoloogiline rekombinatsioon meid huvitava geenijärjestuse ja rakku viidava PCR fragmendi vahel, pidime *E. coli* CFT073 tüvesse viima faag  $\lambda$  *Red*-rekombinaasi kodeeriva plasmidi pKD46. Selleks, et indutseerida *Red*-rekombinaasi geenide ekspressiooni antud plasmiidilt, tuli bakterite kasvukeskkonda lisada L-arabinoosi. Plasmidi viimiseks rakkudesse muutsime bakterirakud elektrokompetentseks (kirjeldatud punktis 2.2.5). Kompetentsetesse rakkudesse elektroporeerisime plasmidi pKD46 nii nagu kirjeldatud punktis 2.2.6. Kuna antud plasmidi puhul on tegemist temperatuuritundliku ja antibiootikumiresistentsust omava plasmiidiga, siis panime rakud elektroporatsiooni järgselt kosuma 30°C juurde. Tunni möödudes külvasime põhja fuugitud rakud LB tardsöötme tassidele, millele oli lisatud ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml ning kasvasime 30°C juures, et selekteerida plasmidi kandvad bakterirakukolooniad. pKD46 plasmidi kandvatest rakkudest tehti kompetentsed rakud (punkt 2.2.5, kuid üleöökuultuuri lahjendus tehti SOB söötmesse, mis sisaldas L-arabinoosi lõppkontsentratsiooniga 1 mM ja ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml).

#### 2.3.1.2 PCR kanamütsiini resistentsust omavalt plasmiidilt pKD13

PCR-i läbiviimiseks plasmiidilt pKD13, tuli meil konstrueerida vastavad praimerid: *marA*-Km1, *marA*-Km2, *rscB*-Km1, *rscB*-Km2 (praimerite järjestused on kantud tabelisse 1). Need

praimerid on komplementaarsed plasmiidis pKD13 asuva *Km* (kanamütsiin) geeni regiooniga ja nende abil on võimalik amplifitseerida PCR produkt, mis sisaldaks tervet *Km* resistentsusgeeni järjestust ja 100 bp ulatuses DNA-d *marA* või *rcsB* geeniga külgnevatest genoomi regioonidest. PCR sooritasime nagu on kirjeldatud punktis 2.2.4 – reaktsiooni kordasime 30 tsükliks: 94°C 30 sekundit, 59°C 30 sekundit, 72°C 2 minutit ning täiendavad 2 minutit 72°C juures. PCR-il saadud DNA fragmente puhastasime *MSB<sup>®</sup> Spin PCRapace and Invisorb<sup>®</sup> Fragment CleanUp* KIT-i kasutades.

#### 2.3.1.3 PCR produkti viimine kompetentsetesse pKD46 plasmidi kandvasse *E. coli* CFT073 tüvesse

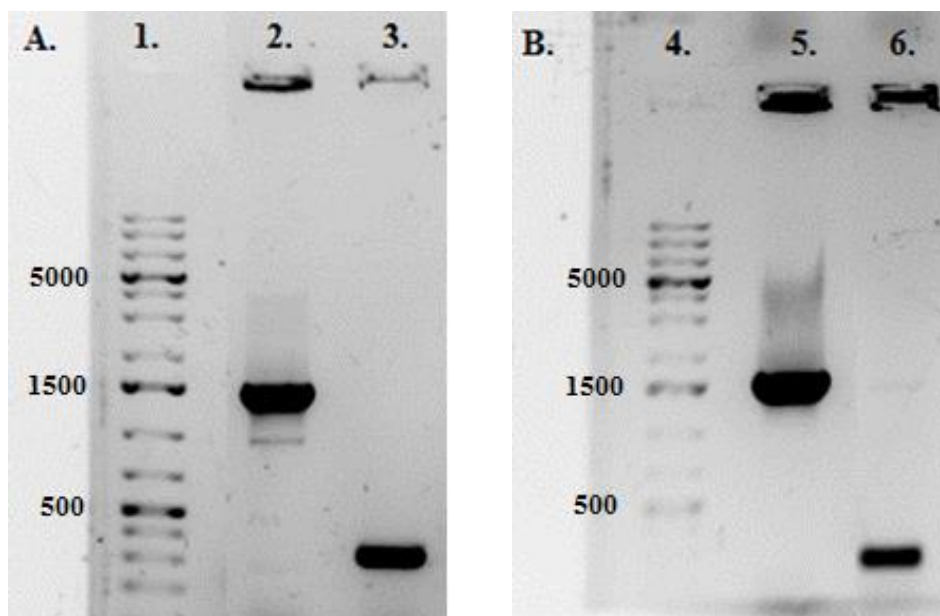
Selleks, et viia PCR-i amplifikatsioonil saadud DNA fragment kompetentsetesse *E. coli* CFT073 [pKD46] rakkudesse, teostasime elektroporatsiooni (kirjeldatud punktis 2.2.6). Pärast poreerimist lisasime rakkudele koheselt sooja SOC söödet, millesse oli lisatud L-arabinoosi lõppkontsentratsiooniga 1 mM. Poreeritud rakke kasvasime seejärel ~2 tundi, misjärel 1/10 bakterikultuurist külvasime kanamütsiini (lõppkontsentratsiooniga 25 µg/ml) sisaldavatele LB tardsöötmeplaatidele ning lasime üleöö kasvada 37°C juures. Kuna plasmidi pKD46 replikatsioon on temperatuuritundlik, siis 37°C juures peaks eeldatavasti antud plasmid rakkudest elimineeruma. Mitte kõik tardsöötmeplokkidele kasvanud kolooniatest polnud soovitud geenikatkestusega. Selleks, et leida katkestatud geeni kandvaid kloonide, teostati PCR kontrollreaktsioon vastavalt, kas *marA*-up ja *marA*-down või *rcsB*-up ja *rcsB*-down praimeritega (tabel 2). Geenikatkestust kandva klooni PCR-produkti oodatav pikkus oli 1500 bp (joonis 2).

#### 2.3.1.4 Kanamütsiini resistentsuse välja rekombineerimine mutantsest tüvest

Saadud mutantide genoomis olev kanamütsiini resistentsust tagav geen on tegelikult raku metabolismile üsnagi koormav ning võib mõjutada edasisi katse tulemusi (fenotüüp võib muutuda). Seetõttu rekombineerisime bakterirakkudest vastava geeni välja, et meil oleks täielikult puhta deletsiooniga mutandid. Järjestus-spetsiifilise rekombinatsiooni läbiviimiseks tegime mutantsest tüvest kompetentsed rakud nii nagu punktis 2.2.5, kus kasutatud söötmetesse lisasime kanamütsiini lõppkontsentratsiooniga 25 µg/ml. Saadud kompetentsetesse rakkudesse viisime elektroporatsiooni (punkt 2.2.6) teel plasmidi pCP20

(temperatuuritundliku replikatsiooniga, ampitsilliini ning klooramfenikooli resistentsusgeeni omav rekombinaasi geeni ekspresseeriv plasmiid). Poreeritud rakud külvasime ampitsilliin (lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml) sisaldavale LB tardsöötmetassile. Rakke kasvasime üleöö 30°C juures. Selleks, et ekspresseerida rekombinaas ja elimineerida rakkudest pCP20 plasmiid, külvasime kolooniad LB tardsöötmetassidele ning kasvasime üleöö 43°C juures. Tekkinud kolooniad olid moodustanud täielikult kanamütsiini resistentsuse kaotanud ja plasmidi mitte-sisaldavad geenideletsiooniga *marA* ja *rscB* *E. coli* CFT073 tüve rakud.

Selleks, et kontrollida, kas kanamütsiini geen on välja rekombineerunud, teostasime kontroll-PCR-i praimeritega *marA*-up, *marA*-down, *rscB*-up ja *rscB*-down (tabel 2). Kontrolliks võtsime kanamütsiinigeeni insertiooniga mutandi. Ilma *Km* geenita ja edukalt katkestatud geeni puhul on PCR-i produkti pikkus alla 500 bp (joonis 2A, rada 3. ja joonis 2B, rada 6.), *Km* geeni olemasolul on PCR-il tekkinud fragmendi pikkus umbes 1500 bp (joonis 2A, rada 2. ja joonis 2B, rada 5.). Seega näitasid kontroll-PCR-i tulemused, et õnnestus konstrueerida *marA* ja *rscB* geenide suhtes defektsed CFT073 tüved.



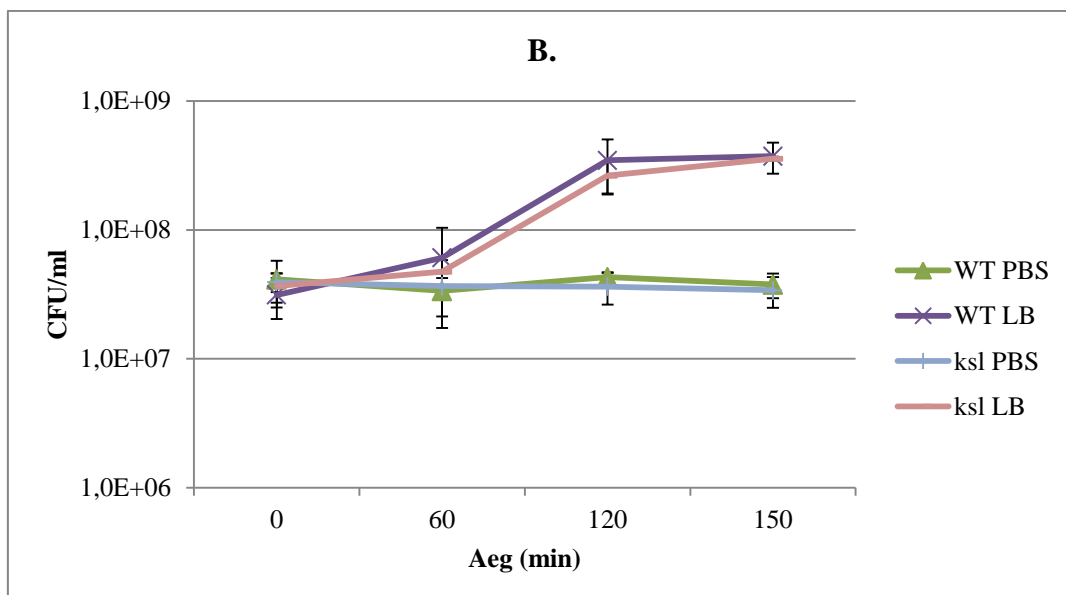
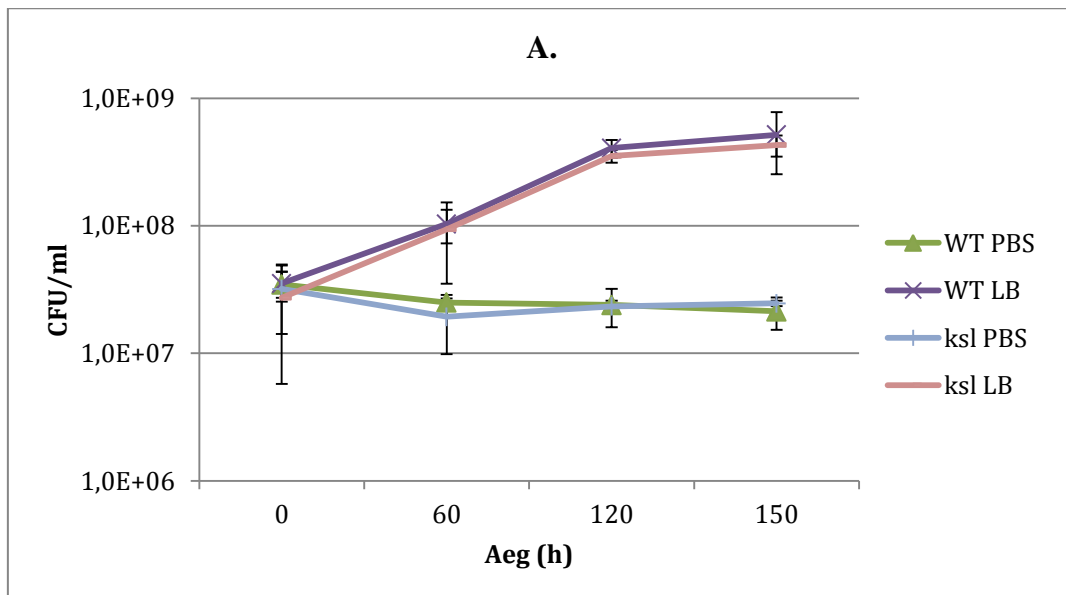
**Joonis 2. Kontroll-PCR geelipilt.** Rajad 1. (joonis 2A) ja 4. (joonis 2B) – DNA marker (Thermo Scientific™ O'GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, Ready-to-Use - 75-20,000 bp).

- A) *E. coli* tüvi CFT073 *marA* geeni suhtes defektne tüvi – CFT*marA* (rada 3.), kontrollina kasutasime *E. coli* tüvi CFT073 *marA::Km* (rada 2.). PCR reaktsioonis kasutasime *marA*-up ja *marA*-down praimereid (tabel 2).
- B) *E. coli* tüvi CFT073 *rscB* geeni suhtes defektne tüvi – CFT*rcsB* (rada 6.), kontrollina kasutasime *E. coli* tüvi CFT073 *rscB::Km* (rada 5.). PCR reaktsioonis kasutasime *rscB*-up ja *rscB*-down praimereid (tabel 2).

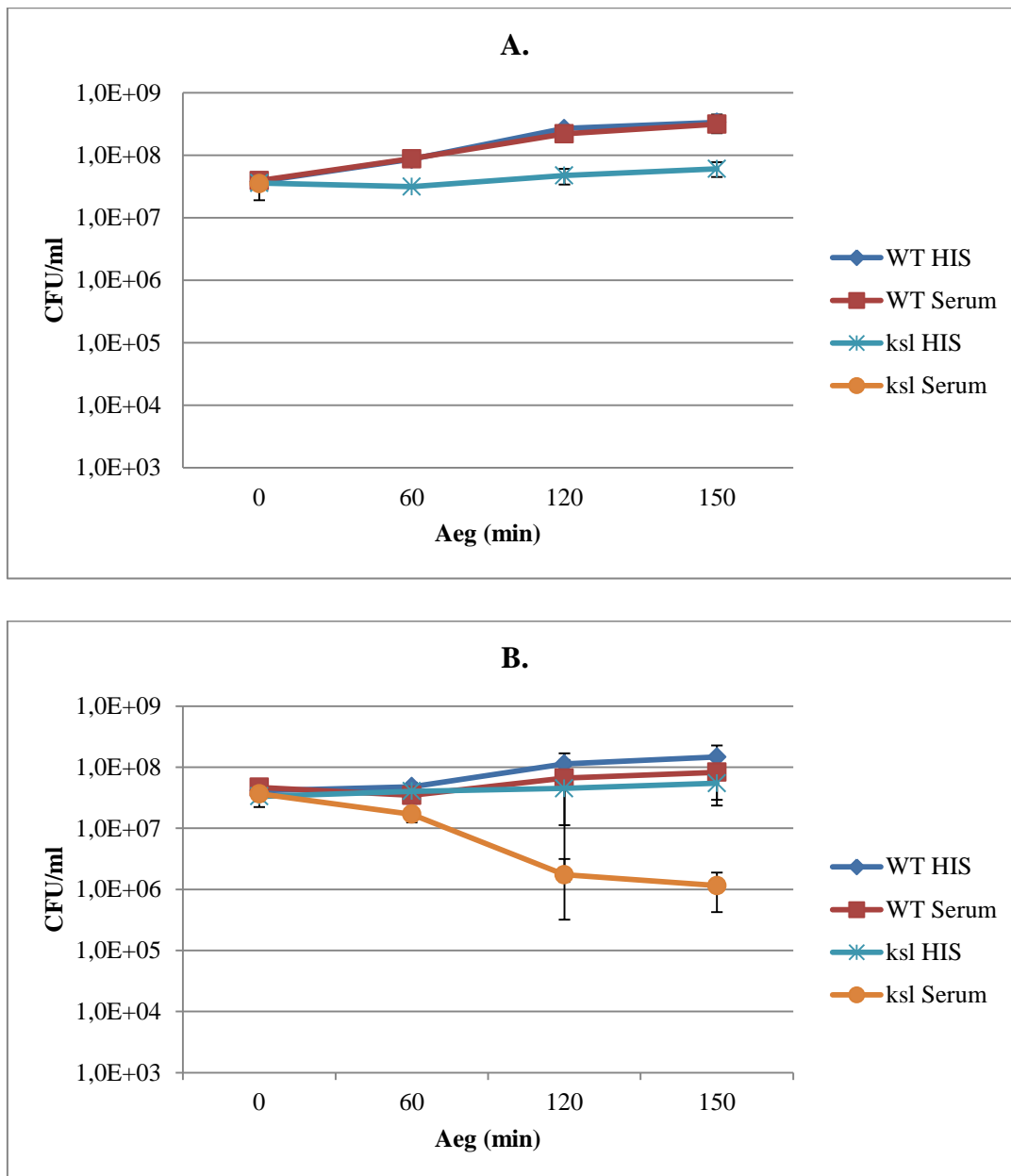
### 2.3.2 Polüsahhariidse kapsli roll *E. coli* tüve CFT073 seerumitolerantsuses

*E. coli* CFT073 tüvi isoleeriti akuutset põelonefriiti põdeva patsiendi verest (Mobley jt, 1990; Welch jt, 2002). Varasemalt on näidatud, et tegemist on tüvega, mida inimese vere seerumis olev komplemendisüsteem ei suuda lüüsida (Buckles jt, 2009). Meie töögrupis on aga kirjeldatud, et kuigi tegemist on tüvega, mis suudab vere seerumis üsna hästi ellu jääda, siis osa bakteripopulatsioonist siiski lüüsub (Putrinš jt, 2015). Täpsemalt näidati, et mitte-jagunevad statsionaarse faasi rakud suudavad hästi vastu seista seerumi lüüsivale toimele. Samas jagunevatest rakkudest osa lüüsub ja vaid osa kiiresti jagunevaist rakkudest suudab ellu jääda (Putrinš jt, 2015). Meid huvitas, milliseid mehhanisme kasutavad erinevad bakterite alampopulatsioonid seerumis ellujäämiseks. Varasemalt oli teada, et polüsahhariidne kapsel on CFT073 jaoks oluline virulentsusfaktor seerumi talumiseks (Buckles jt, 2009; Miajlovic jt, 2014), kuid jagunevaid ja mitte-jagunevaid rakke ei võrreldud samaaegselt. Seetõttu otsustasime teha katse nii eksponentsiaalse faasi kui ka statsionaarse faasi CFT073 algse metsiktüübi ja kapsli suhtes defektse *ksl* tüve rakkudega. Katse tarvis kasvasime eelnevalt rakke, kas 20 tundi (statsionaarne faas) või 2-3 tundi (eksponentsiaalne faas) vedelas LB söötmes. Kasvanud rakkude lahjendustest ( $OD_{600}$  0,1) inokuleeriti 1:1 suhtes vastavalt HIS-i, seerumisse, PBS-i ja LB-sse. Erinevates ajapunktides lahjendati proove fosfaatpuhvrissse ning kanti 5 µl LB tardsöötmetassidele ning inkubeeriti 37°C juures üleöö. Järgmisel päeval loeti kolooniad ja arvutati CFU. Nii statsionaarsete kui eksponentsiaalsete rakkudega katset teostati 3 korduses.





**Joonis 3. *E. coli* CFT073 metsiktüübi (WT) ja *ksl*-mutantse tüve (*ksl*) kasvamine LB-vedelsöötmes ja fosfaatpuhvrts (PBS).** Graafik A – *E. coli* CFT073 metsiktüübi ja *ksl*-mutantse tüve eksponentsiaalse faasi rakkude arvukus 1 ml LB-s ja PBS-s. Rakke kasvatati eelnevalt LB vedelsöötmes 2-3 tundi (eksponentsiaalne faas). Graafik B – *E. coli* CFT073 metsiktüübi ja *ksl*-mutantse tüve statsionaarse faasi rakkude arvukus 1ml LB-s ja PBS-s. Rakke kasvatati katsele eelnevalt 20 tundi LB vedelsöötmes statsionaarse kasvufaasini. Kasvanud rakkude lahjendustest ( $OD_{600}$  0,1) inokuleeriti 1:1 suhtes vastavalt PBS-i ja LB-sse. Erinevates ajapunktides lahjendati proove fosfaatpuhvrtsisse ning kanti 5  $\mu$ l LB tardsöötmetassidele ning inkubeeriti 37°C juures üleöö. Järgmisel päeval loeti kolooniad ja arvutati CFU. Graafikul on esitatud kolme katse keskmised ja standardhälve.

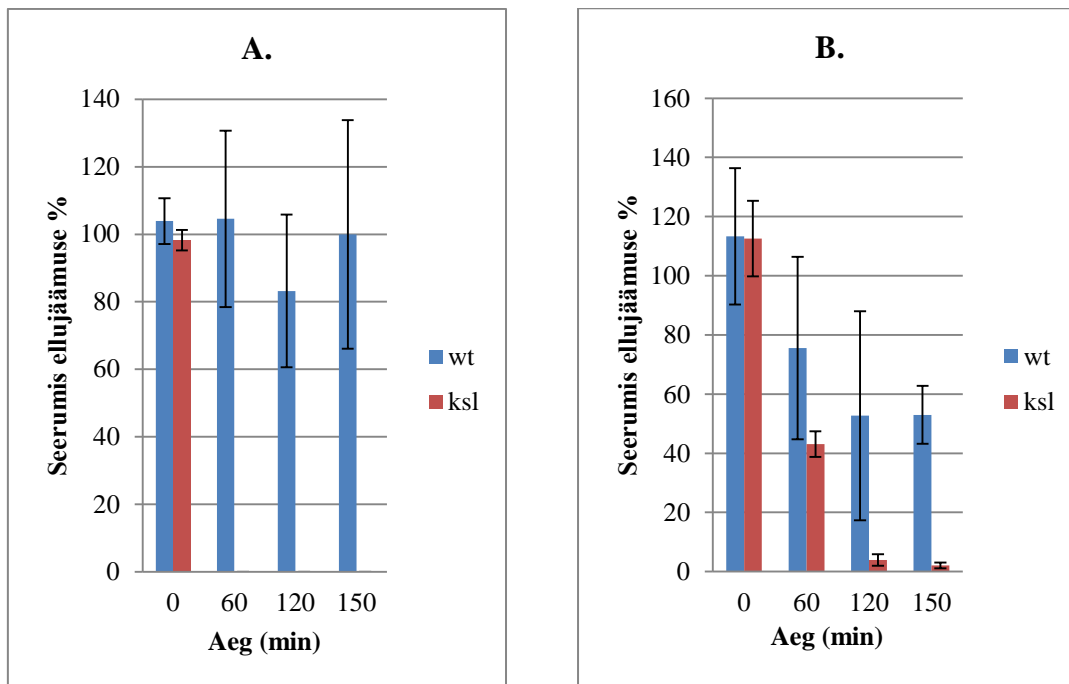


**Joonis 4. *E. coli* CFT073 metsiktüübi (WT) ja *ksl*-mutantse tüve (*ksl*) kasvamine kuumutatud seerumis (HIS) ja inimese vere seerumis (Serum).** Graafik A – *E. coli* CFT073 metsiktüübi ja *ksl*-mutantse tüve eksponentsiaalse faasi rakkude arvukus 1 ml HIS-s ja seerumis. Katsele eelnevalt kasvatati rakke 2-3 tundi eksponentsiaalse kasvufaasini LB vedelsöötmes. Graafik B – *E. coli* CFT073 metsiktüübi ja *ksl*-mutantse tüve statsionaarse faasi rakkude arvukus 1ml HIS-s ja seerumis. Katsele eelnevalt kasvatati rakke 20 tundi statsionaarse kasvufaasini LB vedelsöötmes. Kasvanud rakkude lahjendustest ( $OD_{600}$  0,1) inokuleeriti 1:1 suhtes vastavalt HIS-i ja inimese vere seerumisse. Erinevates ajapunktides lahjendati proove fosfaatpuhvrissse ning kanti 5  $\mu$ l LB tardsöötmetassidele ning inkubeeriti 37°C juures üleöö. Järgmisel päeval loeti kolooniad ja arvutati CFU.  $10^3$  CFU/ml oli väikseim arvukus, mida oli võimalik detekteerida. Graafikul on esitatud kolme katse keskmised ja standardhälve.

Nii statsionaarse kui ka eksponentsiaalse kasvufaasi puhul on näha, et mõlema tüve puhul ei toimu aktiivset kasvu fosfaatpuhvril, küll aga LB-s (joonis 3A ja 3B). Eksponentsiaalse faasi rakkude kasv algas kohe pärast rakkude inokuleerimist söötmesse katse alguses (joonis 3A), statsionaarse faasi rakkude kasv algas pärast 60 minuti möödumist katse algusest (joonis 3B). Kohene eksponentsiaalsete rakkude kasvamine on tingitud sellest, et rakud on log-faasis, kus toimub aktiivne rakkude jagunemine, statsionaarses faasis on rakud lag-faasis, kus aktiivset rakkude jagunemist ei toimu.

Eksponentsiaalse faasi aktiivselt jagunevate *E. coli* tüvi CFT073 (WT) rakkude arvukus tõuseb aktiivselt nii seerumis kui HIS-s. Kapslimutantse tüve (*ksl*) eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude arvukus ei kasva HIS-s nii aktiivselt kui metsiktüübi (WT) arvukus ning katse esimese tunni jooksul langeb *ksl*-defektse tüve rakkude arvukus allapoole detekteerimispiiri ( $10^3$  CFU/ml) (joonis 4A). Statsionaarse faasi aktiivselt mitte-jagunevate metsiktüübi (WT) rakkude arvukus ei tõuse katse esimese tunni jooksul (rakud on lag-faasis) kuid edasine kasv on märgatav nii seerumis kui HIS-s (joonis 4B). Samal ajal on märgatav kapslimutantse tüve (*ksl*) arvukuse järsk langus seerumis juba pärast 60 minuti möödumist. *ksl*-defektse tüve arvukus 120. ja 150. minutil langeb veelgi. Huvitaval kombel ei toimu kapslimutantse (*ksl*) tüve rakkude kasvamist HIS-s ning arvukus jääb katse lõpuni samale tasemele (joonis 4B).

Kuna metsiktüübi ja *ksl*-defektse tüve kasv kuumutatud seerumis (HIS) oli erinev (joonis 4A ja 4B), siis arvutasime CFT073 metsiktüübi ja *ksl*-mutantse tüve ellujäämust inimese vere seerumis võrrelduna HIS-ga. Selleks võrdlesime igas ajapunktis rakkude arvukust seerumis ja eelnevalt kuumutatud seerumis (HIS). Ellujäänud rakkude protsenti arvutasime järgmise valemi abil: Seerum (CFU/ml) x 100% / HIS (CFU/ml).



**Joonis 5. Inimese vere seerumis ellujäämuse % (võrreldes HIS-s ellujäämusega) *E. coli* CFT073 metsiktüübil (wt) ja *ksl*-mutantsel tüvel (ksl).** Graafik A – *E.coli* CFT073 metsiktüübi ja *ksl*-mutantse tüve eksponentsiaalse faasi rakkude ellujäämus inimese 50% vereseerumis. Graafik B – *E.coli* CFT073 metsiktüübi ja *ksl*-mutantse tüve statsionaarse faasi rakkude ellujäämus inimese 50% vereseerumis. Kapsli suhtes defektse tüve (ksl) eksponentsiaalselt kasvavate rakkude CFU/ml seerumis langes juba 60 minuti möödudes alla detekteerimispiiri ( $10^3$  CFU/ml), mistõttu polnud ellujäänud rakkude % võimalik välja arvutada.

Eksponeentsiaalse faasi metsiktüve rakkude lüüsimist seerumi komplemendi poolt ei toimunud (joonis 5A). Samal ajal toimus efektiivne kapslimutantsete eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude lüüsimine (joonis 4A ja 5A). Kuna kapslimutandi (ksl) CFU/ml langes juba 60 minuti möödudes alla detekteerimispiiri, milleks oli  $10^3$  CFU/ml, siis polnud võimalik välja arvutada ellujäänud rakkude %. Saame hinnata, et pärast 60 minuti möödumist oli vähem kui 0,01% (detekteerimispiir) *ksl* geeni defektsetest rakkudest seerumis ellu jäänud (joonis 5A).

Katse tulemustest selgub ka, et üle 70% metsiktüve statsionaarse faasi rakkudest suutsid seerumis pärast 60 minuti möödumist ellu jääda, *ksl* mutandi ellujäämus langes aga 50% ulatuses (joonis 5B). Ka pikemajalisel rakkude inkubeerimisel selgus, et oluliselt rohkem metsiktüve (wt) seerum ei lüüsi. Samal ajal sõltus kapslimutantse tüve (ksl) ellujäämine tugevalt sellest kui kaua rakke seerumis inkubeeriti. 120 ja 150 minuti möödudes katse algusest langes kapsli suhtes mutantse tüve ellujäämus alla 5% (joonis 5B, 150 min).

## 2.4 Arutelu

Antud töös on kirjeldatud eelnevalt väljaalitud geenide *marA* ja *rcsB* katkestamist uropatogeense *E. coli* CFT073 tüvel homoloogilise rekombinatsiooni meetodil, kus kasutatakse  $\lambda$  faagi *Red*-rekombinaasi süsteemi (Datsenko ja Wanner, 2000). Töö käigus selgus, et CFT073 tüves pole geenide katkestamine homoloogilise rekombinatsiooni meetodil nii lihtne, kui *E. coli* laboritüves K-12. Ka kirjanduses on viidatud meetodi kasutamise ebaõnnestumisele patogeensetes *E. coli* tüvedes (k-a CFT073) (Lee jt, 2009).

Samas on mitmetes artiklites (Miajlovic jt, 2014; Buckles jt, 2009) näidatud CFT073 tüve puhul edukad geenikatkestused sama meetodit kasutades. Sellest inspireerituna püüdsime erinevail viisil protokollit täiendada – kompetentsete rakkude valmistamisel (kirjeldatud punktis 2.2.5) pesime rakke 10% glütserooliga enam kui 4 korda, elektroporatsioonil (punkt 2.2.6) lisasime kompetentsetele rakkudele rohkem DNA fragmente sisaldavat proovi (vastavalt 400, 800 ja 1000 ng) ning sooritasime elektroporatsiooni-järgselt mitmeid plaatimisi kohe peale 2 tunnist kosumist ning üleöö toatemperatuuril seisnud proovidest. Kuna kompetentsete rakkude valmistamisel oli silmaga eristatav paksem kiht sadestatud rakkude peal, siis eeldasime, et CFT073 tüve poolt moodustatav paks kapsel pole glütserooliga pestes piisavalt õhuke ning ei lase elektroporatsioonil DNA fragmentidel rakku siseneda ja homoloogilist rekombinatsiooni ei toimu. Kapslist vabanemiseks pidi kompetentsete rakkude valmistamisel 10% glütserooliga pesemist sooritama mitmeid kordi enam.

Käesolevas töös on kirjeldatud uropatogeense *E. coli* CFT073 metsiktüübi ning kapslimutantse tüve statsionaarse ja eksponentsiaalse faasi rakkude seerumitolerantsust. Kuna kirjanduses on viidatud *ksl* geenikatkestuse kõige suuremale mõjule CFT073 tüve seerumitolerantsusele (Buckles jt, 2009), valisime kapslimutantse tüve uurimaks ja võrdlemaks katse tulemusi juba avaldatud töödes (Miajlovic jt, 2014; Buckles jt, 2009) esitatuga.

Antud artiklites (Miajlovic jt, 2014; Buckles jt, 2009) avaldatud tulemused ühtivad meie poolt teostatud katse tulemustega. Kapsel on oluline komponent *E. coli* CFT073 tüve seerumitolerantsuses.

Miajlovic jt (2014) töös on näidatud, et *E. coli* CFT073 tüvi on 50% inimese vere seerumile resistentne. Käesolevas töös kasutasime samuti 50% seerumit ning tulemused ühtivad artiklis

esitatuga. Lisaks näitavad Miajlovic jt (2014), et eksponentsiaalse kasvufaasi aktiivselt jagunevad CFT073 kapslimutantse tüve rakkude arvukus ei lange seerumis täiesti nullini ning mingi osa rakke jääb ellu. Kuna meie poolt läbi viidud katses oli detekteerimispiiriks  $10^3$  CFU/ml, siis ei saanud me tuvastada detekteerimispiirist allpool olevat rakkude arvukust ning hinnata selle langemist täiesti nullini (joonis 4A ja 5A).

Varasemalt on meie töögrupis näidatud, et *E. coli* tüvi CFT073 seerumis ellujäänud rakud pole homogeensed (Putrinš jt, 2015). Seetõttu tekib küsimus, kas kõik rakud (erinevad alampopulatsioonid bakteripopulatsioonis) vajavad kapslit ühtemoodi, et taluda vere seerumi komplementi? Meie poolt teostatud katsed näitavad, et rakkude jagunemisel (eksponentsiaalse faasi rakud) on kapsel eluliselt vajalik. Joonisel 5A on näha, et kapslimutant sureb kiiresti. Seetõttu võib kindalt väita, et meie poolt esitatud katse tulemused on kooskõlas Miajlovic jt (2014) avaldatud tööga, kus tehti samuti katse eksponentsiaalse faasi rakkudega.

Samas on katse tulemustes selgelt eristatav, et statsionaarse faasi rakud ei vaja kapslit sama palju kui aktiivselt jagunevad eksponentsiaalse faasi rakud. Meie katse tulemuste põhjal selgub, et mingi osa statsionaarse faasi rakkudest suudab 60 minuti jooksul peale seerumiga kokku puutumist siiski vaatamata komplemendile ellu jääda (joonis 5B).

Hetkel on uurimise all olnud ainult CFU tase. Samas kui Putrinš jt (2015) avaldatud artiklist on teada, et seerumis võivad ellu jääda nii jagunevad kui mitte-jagunevad rakud. Kuna kapsli suhtes defektssesse tüvesse ja metsiktüüpi on viidud elektroporatsioonil (punkt 2.2.6) pETgfp-*mut2*AGGAGG plasmiid, milles olev *gfp* geeni ekspressioon on indutseeritav IPTG poolt, siis saab teostada täiendavat analüüsi voolutsütomeetriaga. Antud analüüsiga oleks võimalik kindlaks teha, millised rakud jäävad kapslimutantsetest rakkudest vere seerumis ellu. Käesoleva töö tulemused lubavad arvata, et ellu jäävad ainult mitte-jagunevad rakud.

Bakteriaalse infektsiooni ravimisel eeldatakse sageli, et kõik infektsiooni põhjustavatest rakkudest on ühesugused ning et antibiootikum mõjub kõikidele rakkudele ühte moodi. Erinevate infektsiooni põhjustavate patogeenide alampopulatsioonide olemasolul tuleks aga ravimisel läheneda neile erinevalt. Kapsel on UPEC-i puhul üks märklaudatest, mille kaotamisega loodetakse uroinfektsioone ravida (Goller jt, 2014). Samas on näidatud, et mitte kõik rakud ei pruugi populatsioonis kapslit sünteesida – esineb bakteripopulatsiooni fenotüübiline heterogeensus (King jt, 2015). Meie poolt teostatud katsed näitavad, et kuigi kapsel on eluliselt vajalik aktiivselt jagunevate rakkude ellujäämiseks vere seerumis, pole see sama oluline mitte-jagunevate rakkude jaoks.

Edaspidi on oluline välja selgitada, mis võimaldab mitte-jagunevatel statsionaarse faasi rakkudele ellu jääda ning kas on võimalik leida viise muutmaks neid komplemendisüsteemile tundlikumaks. Selliste rakkude seerumitolerantsuse kaotamine on seda olulisem, kuna on teada, et mitte-jagunevad rakud ei allu ka antibiootikumiravile (Putrinš jt, 2015).

## Kokkuvõte

Töö eesmärgiks oli uurida UPEC tüve CFT073 seerumitolerantsuse mehhanisme, milleks katkestati *E. coli* CFT073 tüves *marA* ja *rscB* geenid, et tulevikus teostada katseid uurimaks nende geenide poolt kodeeritud regulaatorvalkude mõju CFT073 tüve seerumitolerantsusele. Seerumitolerantsuse paremaks mõistmiseks uuriti ka CFT073 tüve polüsahhariidse kapsli rolli nii aktiivselt jagunevate kui ka mitte-jagunevate rakkude korral.

Geenide katkestamiseks CFT073 tüves kasutati homoloogilise rekombinatsiooni meetodit (Datsenko ja Wanner, 2000). Valitud geenide suhtes defektsete tüvede konstrueerimine osustus oodatust keerulisemaks, kuna tegu oli metsiktüüpi tüvega, millele on omane paksu kapsli olemasolu. Pika töö tulemusena saavutati *marA* ja *rscB* geenikatkestusega CFT073 tüved, mida kasutatakse edasises töös.

Tuvastamaks polüsahhariidse kapsli rolli *E. coli* tüve CFT073 seerumitolerantsuses, teostati katsed inimese vere seerumis nii aktiivselt jagunevate eksponentsiaalse faasi rakkude kui ka mitte-jagunevate statsionaarse faasi rakkudega ning võrreldi tulemusi varem avaldatud töödega (Buckles jt, 2009; Miajlovic jt, 2014). Katse tulemused ühtisid avaldatud tööde tulemustega, mille põhjal kinnitati fakti, et kapsel on eluliselt tähtis aktiivselt jagunevate rakkude jaoks. Samuti leiti, et mitte-jagunevad statsionaarse faasi rakud ei vaja polüsahhariidset kapslit samavõrd kui aktiivselt jagunevad eksponentsiaalse faasi rakud, ning et mingi osa statsionaarse faasi rakke (alampopulatsioon) suudab inimese vere seerumis ellu jääda ka ilma kapslita.



# Factors that play role in blood serum tolerance of uropathogenic

## *Escherichia coli*

Reti Anmann

### Summary

The human urinary tract is one of the most common sites for bacterial infections. Uncomplicated urinary tract infections (UTIs) account for over 14 million medical visits and almost \$4 billion in medical expenditures each year in the United States alone (Litwin jt, 2005). About 50% of women will experience a UTI at some point in life, while 25% will experience a second UTI (Hunstad and Justice, 2010). Most UTIs develop when microorganisms that colonize the periurethral mucosa ascend through the urethra to the bladder to cause cystitis. The bacteria may breach the kidney parenchyma to enter bloodstream, resulting in bacteremia (Buckles jt, 2009). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) causes up to 90% of all diagnosed UTIs (Hunstad and Justice, 2010). *E.coli* CFT073 is a prototypical urosepsis isolate and has been shown to resist the bactericidal effects of serum (Moblely, 1990; Welch jt, 2002; Buckles jt, 2009).

In this thesis, factors that play role in serum resistance of uropathogenic *E. coli* strain CFT073 were under investigation. To identify determinants that contribute to the serum tolerance of UPEC strain CFT073:

- 1) two mutants with deletations in *marA* or *rcsB* genes were constructed using one-step chromosomal gene inactivation method (Datsenko ja Wanner, 2000)
- 2) survival in human blood serum of an isogenic *ksl(k2)ABCDE* mutant of *E. coli* strain CFT073 that could not synthesize the K2 capsule was compared with wild-type CFT073 using both exponential and stationary phase cells

It was found that using one-step chromosomal gene inactivation method (Datsenko ja Wanner, 2000) to construct *E. coli* strain CFT073 mutants was not so easy as in laboratory strains of *E. coli*. Also it was confirmed that K2 capsule is crucial for *E. coli* strain CFT073 to avoid serum mediated killing as previously demonstrated (Buckles jt, 2009; Miajlovic jt, 2014). More importantly, K2 capsule is crucial for exponential phase cells, but subpopulation of stationary phase cells lacking K2 capsule can survive in blood serum and therefore resist complement mediated killing.

## Kasutatud kirjandus

Allen, P. M., Roberts, I., Boulnois, G. J., Saunders, J. R., & Hart, C. A. (1987). Contribution of capsular polysaccharide and surface properties to virulence of *Escherichia coli* K1. *Infection and Immunity*, 55(11), 2662–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=259958&tool=pmcentrez&rendertren=abstract>

Anderson, G. G., Goller, C. C., Justice, S., Hultgren, S. J., & Seed, P. C. (2010). Polysaccharide capsule and sialic acid-mediated regulation promote biofilm-like intracellular bacterial communities during cystitis. *Infection and Immunity*, 78(3), 963–75. doi:10.1128/IAI.00925-09

Anderson, G. G., Palermo, J. J., Schilling, J. D., Roth, R., Heuser, J., & Hultgren, S. J. (2003). Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5629), 105–7. doi:10.1126/science.1084550

Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. (2012). Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *International Journal of Nephrology*. doi:10.1155/2012/681473

Bigger, J. (1944). TREATMENT OF STAPHYLOCOCCAL INFECTIONS WITH PENICILLIN BY INTERMITTENT STERILISATION. *The Lancet*. doi:10.1016/S0140-6736(00)74210-3

Buckles, E. L., Wang, X., Lane, M. C., Lockatell, C. V., Johnson, D. E., Rasko, D. A., ... Donnenberg, M. S. (2009). Role of the K2 capsule in *Escherichia coli* urinary tract infection and serum resistance. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(11), 1689–97. doi:10.1086/598524

Casaz, P., Garrity-Ryan, L. K., McKenney, D., Jackson, C., Levy, S. B., Tanaka, S. K., & Alekshun, M. N. (2006). MarA, SoxS and Rob function as virulence factors in an *Escherichia coli* murine model of ascending pyelonephritis. *Microbiology*, 152(12), 3643–3650. doi:10.1099/mic.0.2006/000604-0

Cherepanov, P. P. & Wackernagel, W. (1995) *Gene* 158, 9 –14.

- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6640–6645. doi:10.1073/pnas.120163297
- Dhar, N., & McKinney, J. D. (2007). Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. *Current Opinion in Microbiology*. doi:10.1016/j.mib.2006.12.007
- Dunkelberger, J. R., & Song, W. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research*, 20(1), 34–50. doi:10.1038/cr.2009.139
- Foxman, B. (2003). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Disease-a-Month : DM*, 49(2), 53–70. doi:10.1067/mda.2003.7
- Foxman, B., Gillespie, B., Koopman, J., Zhang, L., Palin, K., Tallman, P., ... Marrs, C. F. (2000). Risk Factors for Second Urinary Tract Infection among College Women. *American Journal of Epidemiology*, 151(12), 1194–1205. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a010170
- Goller, C. C., Arshad, M., Noah, J. W., Ananthan, S., Evans, C. W., Nebane, N. M., ... Seed, P. C. (2014). Lifting the mask: Identification of new small molecule inhibitors of uropathogenic *Escherichia coli* group 2 capsule biogenesis. *PLoS ONE*, 9(7). doi:10.1371/journal.pone.0096054
- Henderson, J. P., Crowley, J. R., Pinkner, J. S., Walker, J. N., Tsukayama, P., Stamm, W. E., ... Hultgren, S. J. (2009). Quantitative metabolomics reveals an epigenetic blueprint for iron acquisition in uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathogens*, 5(2), e1000305. doi:10.1371/journal.ppat.1000305
- Hunstad, D. A., & Justice, S. S. (2010). Intracellular lifestyles and immune evasion strategies of uropathogenic *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*, 64, 203–21. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134258
- Johnson, J. R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(1), 80–128. doi:10.1128/CMR.4.1.80.Updated
- Justice, S. S., Hunstad, D. A., Harper, J. R., Duguay, A. R., Pinkner, J. S., Bann, J., ... Hultgren, S. J. (2005). Periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerases are not essential for viability, but SurA is required for pilus biogenesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 187(22), 7680–6. doi:10.1128/JB.187.22.7680-7686.2005

- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(2), 123–40. doi:10.1038/nrmicro818
- King, J. E., Owaif, H. A. A., Jia, J., & Roberts, I. S. (2015). Phenotypic Heterogeneity in Expression of the K1 Polysaccharide Capsule of Uropathogenic *Escherichia coli* and its Down Regulation during Growth in Urine. *Infection and immunity*, IAI-00188.
- Lee, D. J., Bingle, L. E. H., Heurlier, K., Pallen, M. J., Penn, C. W., Busby, S. J. W., & Hobman, J. L. (2009). Gene doctoring: a method for recombineering in laboratory and pathogenic *Escherichia coli* strains. *BMC Microbiology*, 9, 252. doi:10.1186/1471-2180-9-252
- Litwin, M. S., Saigal, C. S., Yano, E. M., Avila, C., Geschwind, S. A., Hanley, J. M., ... Wang, M. (2005). Urologic diseases in America Project: analytical methods and principal findings. *The Journal of Urology*, 173(3), 933–937. doi:10.1097/01.ju.0000152365.43125.3b
- Martinez, J. J., Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Pinkner, J. S., & Hultgren, S. J. (2000). Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *The EMBO Journal*, 19(12), 2803–12. doi:10.1093/emboj/19.12.2803
- Miajlovic, H., & Smith, S. G. (2014). Bacterial self-defence: how *Escherichia coli* evades serum killing. *FEMS Microbiology Letters*, 354(1), 1–9. doi:10.1111/1574-6968.12419
- Miajlovic, H., Cooke, N. M., Moran, G. P., Rogers, T. R. F., & Smith, S. G. (2014). Response of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* to human serum reveals a protective role for Rcs-regulated exopolysaccharide colanic acid. *Infection and Immunity*, 82(1), 298–305. doi:10.1128/IAI.00800-13
- Mobley, H. L., Green, D. M., Trifillis, A. L., Johnson, D. E., Chippendale, G. R., Lockatell, C. V., ... Warren, J. W. (1990). Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: Role of hemolysin in some strains. *Infection and Immunity*, 58(5), 1281–1289.
- Mulvey, M. (2002). Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, 4(5), 257–271. doi:10.1046/j.1462-5822.2002.00193.x
- Mulvey, M. a. (1998). Induction and Evasion of Host Defenses by Type 1-Piliated Uropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, 282(5393), 1494–1497. doi:10.1126/science.282.5393.1494

- Mulvey, M. A., Schilling, J. D., & Hultgren, S. J. (2001). Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infection and Immunity*, 69(7), 4572–9. doi:10.1128/IAI.69.7.4572-4579.2001
- Neilands, J. B. (1995). Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 26723–26726. doi:10.1074/jbc.270.45.26723
- Putrinš, M., Kogermann, K., Lukk, E., Lippus, M., Varik, V., & Tenson, T. (2015). Phenotypic heterogeneity enables uropathogenic *Escherichia coli* to evade killing by antibiotics and serum complement. *Infection and immunity*, IAI-02725.
- Rus, H., Cudrici, C., & Niculescu, F. (2005). The role of the complement system in innate immunity. *Immunologic Research*, 33(2), 103–112.
- Russo, T. a, & Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1753–4. doi:10.1086/315418
- Sarma, J. V., & Ward, P. A. (2011). The complement system. *Cell and Tissue Research*.
- Scholl, D., Adhya, S., & Merril, C. (2005). *Escherichia coli* K1's capsule is a barrier to bacteriophage T7. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4872–4. doi:10.1128/AEM.71.8.4872-4874.2005
- Smith, S. N., Hagan, E. C., Lane, M. C., & Mobley, H. L. T. (2010). Dissemination and systemic colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in a murine model of bacteremia. *mBio*, 1(5). doi:10.1128/mBio.00262-10
- Zhang, J. P., & Normak, S. (1996). Induction of Gene Expression in *Escherichia coli* After Pilus-Mediated Adherence. *Science*, 273, 1234–1236. Retrieved from <http://www.sciencemag.org/content/273/5279/1234.full.pdf>
- Zipfel, P. F., Hallström, T., & Riesbeck, K. (2013). Human complement control and complement evasion by pathogenic microbes--tipping the balance. *Molecular Immunology*, 56(3), 152–60. doi:10.1016/j.molimm.2013.05.222
- Vimberg, V., Tats, A., Remm, M., & Tenson, T. (2007). Translation initiation region sequence preferences in *Escherichia coli*. *BMC Molecular Biology*, 8, 100. doi:10.1186/1471-2199-8-100

- Watts, R. E., Totsika, M., Challinor, V. L., Mabbett, A. N., Ulett, G. C., De Voss, J. J., & Schembri, M. A. (2012). Contribution of siderophore systems to growth and urinary tract colonization of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 80(1), 333–44. doi:10.1128/IAI.05594-11
- Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., ... Blattner, F. R. (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), 17020–17024. doi:10.1073/pnas.252529799
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*, 85(1), 11–9. doi:10.1016/j.yexmp.2008.03.007
- Wright, K. J., Seed, P. C., & Hultgren, S. J. (2007). Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cellular Microbiology*, 9(9), 2230–41. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00952.x
- Yan, F., & Polk, D. B. (2004). Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Current Opinion in Gastroenterology*, 20(6), 565–571. doi:10.1097/00001574-200411000-00011

## **Kasutatud veebiaadressid**

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Complement\\_pathway.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Complement_pathway.png) (20.10.14)

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) (07.01.15)

## **Lihtlitsents**

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Reti Anmann,

(sünnikuupäev: 07.04.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Uropatogeense E. coli, seerumitolerantsuses osalevad faktorid“, mille juhendaja on Marta Putrinš,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015



## **Tänuõnad**

Eelkõige tahan ma tänada oma suurepärast tarka juhendajat Marta Putrinšit, kelle kannatlikkus mind juhendades ületas kõik piirid. Juhendajana suutis ta külma närvi säilitades vastata kõigile minu pähe tulnud küsimustele olgu need nii iseenesest mõistetavad kui tahes. Muidugi tänan ka Tanel Tensoni töögruppi kuuluvaid inimesi, kes nõu ja jõuga väiksemal või suuremal määral minu tööle kaasa aitasid.

Ning tänamata ei jää ka minu kallis perekond ning armasad sõbrad, kes laboris ebaõnnestunud katse korral mind korduvalt lohutada püüdsid ning edasiseks tööks innukust süstisid.

Aitäh teile kõigile!